

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Identificación de biotipos de *Yersinia ruckeri* aisladas  
en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa  
juvenil procedentes de dos piscigranjas de la región  
Junín**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

John Edward López Cadillo

**ASESOR**

Nieves Sandoval Chaupe

Lima - Perú

2012



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

**Facultad de Medicina Veterinaria**

ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 184-EAPMV/FMV-2012

PRESIDENTE :

JOLGA MIRTHA LI ELÍAS

MIEMBROS :

NIEVES SANDOVAL CHAUPE  
Asesora de la Tesis

ARNALDO ALVARADO SÁNCHEZ

MIRYAM QUEVEDO URDAY

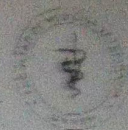
San Borja, 14 de diciembre de 2012

V° B°

MV. ALBERTO MANCHEGO SAYÁN  
Director de la Escuela Académico Profesional de  
Medicina Veterinaria







### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día viernes 14 de Diciembre del 2012, a las 12:00 horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 184-EAPMV/FMV-2012, integrado por los siguientes profesores:

OLGA MIRTHA LI ELÍAS	Presidente del Jurado
NIEVES SANDOVAL CHAUPE	Asesora de la Tesis
ARNALDO ALVARADO SÁNCHEZ	Miembro del Jurado
MIRYAM QUEVEDO URDAY	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: LÓPEZ CADILLO, JHON EDWARD, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

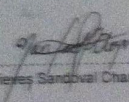
**"IDENTIFICACIÓN DE BIOTIPOS EN *Yersinia ruckeri* AISLADAS EN TRUCHAS ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EN ETAPA JUVENIL PROCEDENTES DE DOS PISCIGRANJAS DE LA REGIÓN JUNÍN"**

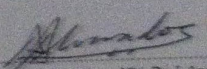
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE ( 17 )**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las: **13:30 Horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuádruplicado los integrantes del Jurado:

  
Olga Mirtha Li Elías, Mg. Prof. Principal, D.E.

  
Nieves Sandoval Chaupe, Mg. Prof. Principal, D.E.

  
Arnaldo Alvarado Sánchez, MV. Prof. Asociado, T.P.

  
Miryam Quevedo Urday, MV. Profesora Contratada



## **DEDICATORIA**

La concepción de este proyecto está dedicada a mis padres, pilares fundamentales en mi vida. Sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora. Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir. También dedico este proyecto a mi esposa Isabel compañera inseparable de cada jornada. Ella representó gran esfuerzo y tesón en momentos de decline y cansancio, y por ultimo a mis hijos Cristopher, Diego y Daniela, que son mi inspiración. A ellos este proyecto, ya que sin ellos, no hubiese podido ser.

## **AGRADECIMIENTO**

El presente trabajo de tesis primeramente me gustaría agradecerle a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado. A la UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional. A mi directora de tesis, Dra. Nieves Sandoval Chaupe por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado que pueda terminar mis estudios con éxito. También me gustaría agradecer a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación. Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecer su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones. Para ellos: Muchas gracias y que Dios los bendiga.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	ii
LISTA DE CUADROS .....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	3
2.1 Situacion actual de la acuicultura.....	3
2.2 Trucha Arcoiris .....	4
2.2.1 Clasificación Taxonómica.....	4
2.2.2 Características biológicas.....	4
2.3 El Microorganismo.....	5
2.3.1 Características generales.....	5
2.3.2 Biotipos.....	6
2.3.3 Factores de virulencia.....	7
2.3.3.1 Toxinas extracelulares.....	7
2.3.3.2 Adhesinas e invasinas.....	8
2.3.3.3 Ruckerbactin.....	8
2.4 La Enfermedad.....	9
2.4.1 Hospedero.....	9
2.4.1.1 Patogénesis.....	10
2.4.1.2 Signos clínicos.....	11

2.4.2 Epidemiología.....	12
2.4.3 Diagnóstico.....	12
2.4.4 Control y Prevención.....	14
3. MATERIALES Y METODOS.....	15
3.1 Lugar de estudio.....	15
3.2 Procedencia de las muestras.....	15
3.3 Tamaño muestral.....	16
3.4 características de la muestra.....	16
3.5 Metodología .....	16
3.5.1. Obtención de muestras.....	16
3.5.2. Procesamiento de muestras.....	16
3.5.3. Determinación del biotipo.....	18
4.- RESULTADOS.....	18
4.1. Parámetros del Agua.....	18
4.2. Examen de Necropsia.....	19
4.3. Análisis Microbiológico.....	23
4.4. Análisis de Biotipos.....	28
5.- DISCUSION.....	30
6.- CONCLUSIONES .....	33
7.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	34

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue la Identificación de Biotipos de *Yersinia ruckeri* aisladas en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) procedentes de dos piscigranjas de la región Junín. Se utilizaron 30 truchas “arcoíris” (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa juvenil por cada piscigranja. Una de las piscigranjas estuvo ubicada en la provincia de Concepción y la otra en el distrito de Molinos, en la provincia de Jauja. Los peces colectados presentaron signos generales de enfermedad. Se realizó la necropsia y se colectaron muestras de riñón y bazo para el estudio bacteriológico, mediante hisopados mantenidos en medio de transporte Stuart. Posteriormente los hisopos fueron cultivados en medio TSA (agar tripticasa soja) e incubados a 22°C por 24-48 horas. Se seleccionaron las colonias que eran similares a las descritas para *Yersinia ruckeri*, y se realizó la identificación mediante pruebas bioquímicas utilizando un perfil de 15 reacciones. Para la identificación del Biotipo de *Yersinia ruckeri* se basó en la motilidad y la hidrólisis del Tween 20 y del Tween 80. El biotipo 1 es motil e hidroliza el Tween 20 y el Tween 80 y el biotipo 2 es no motil y no hidroliza el Tween 20 ni el Tween 80. Se obtuvieron cepas de *Y. ruckeri* biotipo 1 en las dos piscigranjas en estudio y la presencia de *Y. ruckeri* biotipo 2 solo en la piscigranja del distrito de Molinos.

Palabras clave: *Yersinia ruckeri*, biotipo 1, biotipo 2.



## SUMMARY

The aim of this study was the identification of biotypes of *Yersinia ruckeri* isolated in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from two fish farms in the Junin region. 30 trout "rainbow" (*Oncorhynchus mykiss*) were used in juvenile stage for each fish farm. One of the fish farms was located in the province of Concepción and the other in the district of Molinos in the province of Jauja. The collected fish showed general signs of disease. Necropsy was performed and samples of kidney and spleen for bacteriological study were collected using swabs kept in Stuart transport medium. Subsequently swabs were cultured on TSA medium (trypticase soy agar) and incubated at 22 ° C for 24-48 hours. Colonies were similar to those described for *Yersinia ruckeri* was selected, and the identification was performed by biochemical tests using a profile 15 reactions. For the identification of *Yersinia ruckeri* Biotype relied on motility and hydrolysis of Tween 20 and Tween 80. The biotype 1 is motile and hydrolyzes Tween 20 and Tween 80 and biotype 2 is not motile and non-hydrolyzed Tween Tween 20 or 80 strains of *Y. ruckeri* biotype 1 in the two fish farms studied and the presence of *Y. ruckeri* biovar 2 single fish farm in the district of Molinos were obtained.

Keywords: *Yersinia ruckeri*, biotipo 1, biotipo 2.

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Parámetros de calidad del agua en piscigranja el “Edén y Arco iris”. **Pág. 18**

Cuadro 2. Lesiones macroscópicas externas observadas a la necropsia de truchas arcoíris procedentes de las piscigranjas Edén y Arcoíris. **Pág. 21**

Cuadro 3. Lesiones macroscópicas internas observadas a la necropsia de truchas arcoíris procedentes de las piscigranjas Eden y Arcoiris. **Pág. 23**

Cuadro 4: Bacterias aisladas en las piscigranjas el Edén y Arcoíris. **Pág. 24**

Cuadro 5: Identificación por coloración Gram. **Pág. 24**

Cuadro 6: Enterobacterias identificadas en las piscigranjas Eden y Arcoiris. **Pág. 25**

Cuadro 7: Pruebas bioquímicas para la identificación del genero y especie en las piscigranjas el Edén y Arcoiris. **Pág. 26**

Cuadro 8: Determinacion de Biotipos. **Pág. 29**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Trucha con exoftalmia y ojos hemorrágicos. **Pág. 19**

Figura 2. Trucha con melanosis. **Pág. 20**

Figura 3. Ulceras en piel. **Pág. 20**

Figura 4. Trucha con Exoftalmia y con petequias en Hígado. **Pág. 22**

Figura 5. Trucha con esplenomegalia. **Pág. 22**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ERM	Enteric Redmouth – Enfermedad de la boca roja
FAO	Food and agriculture organization of the United Nations - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
TSA	Tripticasa soja agar.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la trucha “arcoíris” *Oncorhynchus mykiss*, es una actividad de la acuicultura de gran importancia en nuestro país, siendo esta especie introducida una de las mas cultivadas en muchas piscigranjas de la región Puno y Junín (PRODUCE 2010). Sin embargo a pesar del incremento y desarrollo de este cultivo, esta no ha ido de la mano con la sanidad acuícola, lo cual se evidencia en la falta de métodos diagnósticos confiables para una rápida detección que se pueda aplicar para un diagnóstico rutinario.

El manejo y control de las enfermedades infecciosas que afectan a los peces es muy importante para un desarrollo productivo de la industria acuícola, así en piscigranjas donde los peces son criados en condiciones de cultivo intensivo, es indispensable que se desarrollen medidas adecuadas para el control de las diversas enfermedades.

En nuestro país, los problemas sanitarios que afectan la producción de las truchas son escasos, si nos comparamos a nuestro vecino país Chile, el manejo sanitario en el Perú en este tipo de cultivos tiene muchos aspectos que mejorar.

Se conoce la presencia de diversas enfermedades infecciosas en nuestro país que afectan el cultivo de la trucha “arcoíris”, dentro de estas enfermedades se encuentra la Yersiniosis o la enfermedad entérica de la boca roja (Enteric Redmouth-ERM por sus siglas en inglés), la que representa un problema sanitario y económico en piscigranjas que se dedican al cultivo de truchas en el país, debido a que existe poca información acerca de esta enfermedad y otras presentes en la trucha “arcoíris” (Bravo y Kojagura, 2004) de nuestro medio.

La Yersiniosis o la enfermedad de la boca roja es considerada una de las enfermedades de mayor relevancia en la industria del cultivo de los salmónidos (Furones *et al*, 1993; Akhlaghi y Sharifi, 2008), el agente etiológico de esta enfermedad es la bacteria *Yersinia ruckeri*, bacteria Gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, la cual esta ampliamente distribuida en muchas áreas dedicadas a la industria de los salmónidos en el mundo (Evenhuis *et al.*, 2009). Las cepas de *Yersinia ruckeri* pueden ser divididos en

2 biotipos, biotipo 1 y 2, basados en su capacidad de fermentar el sorbitol, hidrólisis del Tween 20 y Tween 80, y en la motilidad (Tobback, 2009).

Busch (1982) describe cepas de *Yersinia ruckeri* inmóviles, e incapaces de hidrolizar el tween 80, en su estudio encuentra que el 18% de las cepas eran inmóviles, y el 14% no hidrolizaba el tween 80, pero no se percató que estas características estaban relacionadas. Davies y Frerichs (1989), encuentran que de las 147 cepas que examinaron de diferentes áreas geográficas, encontraron que todas las cepas inmóviles obtenidas no hidrolizaban el tween y viceversa, a este grupo claramente definido de aislados de Inglaterra y Noruega fue designado como *Yersinia ruckeri* biotipo 2, para poder diferenciarlo del biotipo descrito originalmente, el de Hagerman aislado en Idaho.

En la actualidad hay pocos estudios acerca de la Yersiniosis en truchas “arcoíris” que se cultivan en el Perú, los estudios previos, nos demuestran que esta enfermedad se encuentra diseminada en muchas piscigranjas de la región Junín, es por ello la importancia de tener mas conocimiento de esta enfermedad para tomar medidas al respecto. En nuestro país la yersiniosis representa un riesgo para la crianza de truchas “arcoíris”, la cual ha generado muchas pérdidas económicas.

Por ello, el objetivo del presente estudio es identificar la presencia de *Yersinia ruckeri* y los biotipos que se encuentran en dichas piscigranjas evaluadas, así como determinar cual es el biotipo predominante.



## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA**

La acuicultura es una actividad que se desarrolla en ambientes seleccionados y controlados de especies que se cultivan en el medio acuático. Por otro lado, la interacción entre el hombre y el agua aplicando técnicas competitivas de calidad sanitaria y comercial, es considerada también una buena alternativa para la administración de los recursos acuáticos (FAO, 2010)

A nivel mundial la acuicultura a reportado un incremento superior al 25% en los últimos 5 años, todo debido al incremento de la demanda de productos provenientes de esta actividad y a la disminución de peces obtenidos por pesca (FAO, 2010).

Dentro de la acuicultura una de las especies de mayor cultivo es la de los salmónidos, alcanzando 2 295 523 TM en el año 2008 (FAO, 2010), siendo Noruega y Chile los principales y mayores países productores, con 44% y 34% respectivamente, y dentro de esta actividad, la producción de trucha “arcoíris”, mostró el año 2008 una cifra de 576 289 TM a nivel mundial (FAO, 2010).

Para el año 2008, según informes de la FAO, setenta y nueve países se dedicaban a la producción de la trucha “arcoíris”, pero muchos de estos a menor escala en comparación con los principales países productores (FAO, 2010).

En el Perú, la acuicultura se ha incrementado en estos últimos años, siendo la trucha la especie que presenta mayor crecimiento, localizándose este cultivo principalmente en zonas altoandinas, como Puno y Junín, regiones donde se encuentran las principales empresas dedicadas a esta actividad (PRODUCE, 2010).

## **2.2 TRUCHA ARCOÍRIS**

### **2.2.1 Clasificación taxonómica**

Según Smith and Stearley (1989):

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Sub Phylum: Vertebrata

Clase: Actinopterygii

Orden: Salmoniformes

Sub Orden: Salmoneidei

Familia: Salmonidae

Género: *Oncorhynchus*

Especie: *Oncorhynchus mykiss*

Nombre Vulgar: Trucha “arcoíris”

Nombre Ingles: *Rainbow trout*.

### **2.2.2 Características biológicas**

La trucha arco iris es nativa de la desembocadura de los ríos en el Océano Pacífico en Norte América, desde Alaska hasta México, desde el año 1874 se ha introducido a varios países, para fines de pesca recreativa y de acuicultura. Esta especie es un pez muy resistente, de fácil desove, de crecimiento rápido, muy tolerante a una amplia gama de ambientes y a la manipulación (FAO, 2009).

En nuestro país la trucha ha sido la primera especie en el desarrollo de la acuicultura, así en 1982 se importaron 50 000 ovas embrionadas procedentes de los Estados Unidos, a un criadero particular de la Oroya (Godoy 2002).

La trucha “arcoíris” tiene el cuerpo alargado y fusiforme con 60-66 vértebras, posee una aleta adiposa, generalmente de borde negro. El dorso, los flancos, la cabeza y aletas se encuentran cubiertos de pequeños puntos negros, siendo esta coloración dependiente del hábitat en el que se encuentra. La Coloración varía con el hábitat, tamaño y condición sexual, habiendo una tendencia en truchas de río y reproductores de ser más oscuras y presentar colores más intensos, mientras que las truchas de lago son más brillantes y de color plateado (FAO, 2009).

La temperatura del agua óptima para el cultivo de la trucha “arcoíris” esta por debajo de 21°C, sin embargo esta especie puede tolerar una amplia gama de temperaturas, desde 0 a 27 °C, siendo las zonas de desove las que requieren temperaturas de 9 a 14°C (FAO, 2009).

En condiciones naturales los adultos de las truchas “arcoíris”, se alimentan de insectos terrestres y acuáticos, crustáceos, moluscos, huevos de peces y peces pequeños, pero un alimento de importancia son los camarones de agua dulce, las cuales contienen pigmentos carotenoides responsables de la coloración naranja – en algunos color rosa de la carne, en el cultivo de las truchas la inclusión de pigmentos sintéticos como la astaxantina y cantaxantina en el alimento es la que produce esta coloración (FAO, 2009).

## **2.3 EL MICROORGANISMO**

### **2.3.1 Características generales**

*Yersinia ruckeri* es una enterobacteria Gram-negativa responsable de la enfermedad de la Boca Roja, infección septicémica de curso agudo a crónico que afecta a salmónidos, causante de

una alta mortalidad y elevadas pérdidas económicas en piscifactorías, especialmente en trucha arco iris y en salmón atlántico (Ewing et al. 1978). Es un bacilo corto (1.5-2.0  $\mu\text{m}$  por 0,5  $\mu\text{m}$ ) que se observa generalmente sólo o asociado en pequeñas cadenas, la presencia de flagelación peritrica le confiere a *Y. ruckeri* la característica de motilidad, la cual muchos autores mencionan que esta relacionada con la temperatura de incubación, siendo la temperatura optima de crecimiento de entre 22°C y 25°C (O'Leary y col., 1979; Furones y col., 1993).

Bioquímicamente, *Yersinia ruckeri* es un microorganismo con metabolismo fermentativo, positivo a pruebas como motilidad, rojo-metilo, degradación de gelatina y tween 80, reducción de nitratos, producción de ácido a partir de maltosa, manitol, trehalosa, glicerol y negativo a citocromo oxidasa, voges-proskauer, desaminación de la fenilalanina, degradación de esculina, gas de glucosa, fluorescencia, producción de indol, producción de hidrogeno sulfurado en TSI, producción de ácido a partir de lactosa, sacarosa, inositol, arabinosa, sorbitol, salicina, rhamnosa y xilosa (Wobeser, 1973; Ewing et al., 1978; O'Leary et al., 1979; Stevenson y Daly, 1982; Austin y Austin, 1999; Davies y Frerichs, 1989; Furones et al., 1993). Sin embargo, se han reportado resultados variables en algunas pruebas como rojo-metilo, voges-proskauer, motilidad a 25°C, liquefacción de la gelatina, fermentación del sorbitol y arabinosa (Stevenson y Daly, 1982)

### **2.3.2 Biotipos**

Las cepas de *Yersinia ruckeri* pueden ser divididos en 2 biotipos, biotipo 1 y 2, basados en su capacidad de fermentar el sorbitol, hidrólisis del Tween 20 y Tween 80, y en la motilidad (Tobback, 2009).

Busch (1982) describe cepas de *Yersinia ruckeri* inmóviles, e incapaces de hidrolizar el Tween 80. En su estudio, determinó que el 18% de las cepas eran inmóviles, y el 14% no hidrolizaba el Tween 80, pero no se percató que estas características estaban relacionadas. Davies y Frerichs (1989), determinaron que las 147 cepas examinadas aisladas de diferentes áreas geográficas, eran inmóviles y no hidrolizaban el Tween y viceversa, a este grupo claramente definido de aislados de Inglaterra y Noruega fue designado como *Yersinia ruckeri* biotipo 2, para poder diferenciarlo del biotipo descrito originalmente, el de Hagerman aislado en Idaho.

### **2.3.3 Factores de virulencia**

#### **2.3.3.1 Toxinas extracelulares**

La bacteria *Yersinia ruckeri* produce productos extracelulares como lipasas, proteasas, hemolisinas, las cuales producen los signos típicos de la enfermedad como las zonas hemorrágicas a nivel de la boca y el intestino (Bourne *et al.*, 2009).

Dentro de las proteasas se encuentra Yrp1 la cual es importante para la virulencia de la bacteria en la colonización e invasión de los tejidos, esta enzima puede degradar una amplia variedad de matrices extracelulares y de proteínas musculares, alterando la morfología de la membrana y la porosidad de los vasos sanguíneos (Fernández *et al.*, 2003; Gibello *et al.*, 2004; Ryckaert *et al.* 2010; Dahiya y Stevenson, 2010), la expresión de esta proteasa está relacionada con las condiciones medioambientales, así las concentraciones bajas de carbono y nitrógeno inhiben su expresión (Wiens y Vallejo, 2010; Ryckaert *et al.*, 2010; Tobback *et al.*, 2010a), sin embargo la glucosa y la fructosa también son reconocidos como altos inhibidores de la producción de la proteasa, pero los carbohidratos como el glicerol, manitol, maltosa, no presentan ese efecto

inhibidor (Mendez *et al.*, 2010; Navais *et al.*, 2010), esta proteasa también es regulada por la osmolaridad y la temperatura del medio. (Mendez *et al.*, 2010).

La hemolisina Yhla también desempeña un rol importante en el proceso de patogenicidad de la *Yersinia ruckeri*, teniendo esta proteína la capacidad de lisar a los eritrocitos (Fernandez *et al.*, 2007b).

#### **2.3.3.2 Adhesinas e invasinas**

Dentro del género *Yersinia*, podemos encontrar tres tipos de adhesinas las cuales son: la invasina, Ail y YadA (Romalde y Toranzo, 1993; Fernandez *et al.*, 2004; Tobback *et al.*, 2010b). Las adhesinas permiten la internalización de la bacteria en el macrófago, neutrófilos y células dendríticas (Romalde y Toranzo, 1993), en el caso de *Yersinia ruckeri* no existe evidencia científica muy clara en este punto, sin embargo se pudo encontrar algunas células dentro de los fagocitos en truchas “arcoíris” luego de una inmersión e infección intraperitoneal mediante la identificación de un proteína verde fluorescente (Welch y Wiens, 2005).

#### **2.3.3.3 Ruckerbactin**

La captación del hierro es un factor muy importante para el proceso de colonización e invasión de *Yersinia ruckeri*, en 1991 algunos estudios determinaron la capacidad de *Yersinia ruckeri* de crecer bajo condiciones limitantes de hierro mostrando que la bacteria era capaz de crecer en presencia de un compuesto quelante. Los resultados obtenidos fueron contradictorios y solo uno de ellos mostro la producción de un sistema con alta afinidad por la captación de hierro por esta



bacteria (Romalde et al., 1991). Sin embargo las investigaciones reportaron la inducción de algunas OMPs en bajas concentraciones de hierro (Davies, 1991b; Romalde et al., 1991).

En el 2004 un grupo de investigadores encontró un grupo de genes inducido in vivo, que era necesario para la síntesis y utilización de un sideroforo, catecholate, denominado ruckerbactin, que posiblemente corresponda a la actividad detectada por Romalde y colaboradores (Fernandez et al., 2004)

En el 2004 Fernandez y colaboradores encontraron un grupo de genes que fueron inducidos in vivo necesarios para la síntesis y uso del sideroforo catecholate, denominado ruckerbactin que posiblemente sea la misma actividad que detecto Romalde et al. (1991). Se demuestra que la Ruckerbactin se encuentra relacionado con la captación del hierro, la obtención del hierro del medio ambiente es un requisito primordial del proceso de infección por *Yersinia ruckeri* (Fernández et al., 2004)

## **2.4 LA ENFERMEDAD**

### **2.4.1 Hospedero**

La bacteria *Yersinia ruckeri* afecta severamente a la trucha “arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*) pero también ha sido reportado en el salmón coho *Oncorhynchus kitush* (Dulin et al, 1976), salmón rojo *Oncorhynchus nerka*, salmón real *Oncorhynchus tshawytscha*, trucha degollada *Salmon clarki*, salmón del atlántico *Salmon salar* (Bullock et al, 1978), trucha marrón *Salmon trutta*, trucha ártica *Salvelinus alpinus* y la trucha de manantial (Tobback et al., 2007; Arias et al., 2007).

También hay especies de peces no salmónidos que han sido reportados como portadores del patógeno, las cuales incluyen al goldfish, *Carassius auratus* (McArdle and Dooley-Martin, 1985); *Notropis atherinoides* (Mitchum, 1981); arenque de lago, *Coregonus artedii* (Bullock and Anderson, 1984), pececillos, *Pimephales promelas* (Michel *et al.*, 1986) y Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* (Danley *et al.*, 1999). En ambientes marinos también se ha podido encontrar la presencia de *Yersinia ruckeri* en peces marinos como, el turbot o rodaballo, *Scophthalmus maximus*, *Dicentrarchus labrax*, *Sparus auratus*, entre otros (Vigneulle, 1990).

#### **2.4.1.1 Patogénesis**

El proceso de infección por *Yersinia ruckeri* comienza a través de la diseminación de la bacteria entre peces a través del contacto directo de un pez infectado o portador a uno sano, determinándose que en una población de trucha “arcoíris” más del 25% posee a este agente en la parte posterior del intestino delgado (Romalde y Toranzo, 1993; Ryckaert *et al.*, 2010).

Se ha determinado que la vía de ingreso de la bacteria es el tejido branquial, encontrándose en las dos primeras horas de infección por *Yersinia ruckeri* la mayor población de esta bacteria se encuentra en el mucus branquial, pasando luego al tejido vascular branquial, en donde se iniciaría el proceso septicémico de la bacteria (Neumann y Tripp, 1986, Tobback *et al.*, 2009).

*Yersinia ruckeri* también puede adherirse a otras superficies corporales del pez en donde se puede encontrar gran cantidad de la bacteria en el intestino como en la piel, inmediatamente después de la infección (Tobback *et al.*, 2010b).

Después de dos meses de haberse presentado un brote por *Yersinia ruckeri* se logró aislar este agente a partir de las heces de los peces (Tobback *et al.*, 2010b; Tobback *et al.*, 2009).

Si ya se sabe la presencia de *Yersinia ruckeri* en un determinado lugar y acontece un factor ambiental que produzca estrés en el pez, o la calidad del agua se ve disminuida, la sintomatología o la mortalidad de los peces aparece a los 3-5 días post- infección y si no se ha reportado la presencia de este agente, las sintomatología se presentaría 3-7 días post- infección (Hamdi Avci, 2005).

Coquet *et al.* (2002) determina la presencia de *Yersinia ruckeri* en diferentes tipos de soportes solidos formando biofilms, determinando la capacidad de este agente para formarlos, estos biofilms podrían ser una fuente de reinfección en piscigranjas de truchas “arcoíris”.

No se demostrado la transmisión vertical en el caso de *Yersinia ruckeri*, sin embargo se ha encontrado al agente en ovas no fertilizadas de Salmon chinook con escasa mortalidad a las doce semanas de ser alimentados (Coquet *et al.*, 2002).

Las diversas enfermedades bacterianas que se presentan en los peces son causadas por bacterias que naturalmente forman parte de su microbiota o del medio ambiente acuático, convirtiéndose estas bacterias en patógenos oportunistas, lo que es considerado un riesgo en la calidad sanitaria de los sistemas acuícolas (Rubio, 2010).

#### **2.4.1.2 Signos clínicos**

Los signos clínicos de esta enfermedad en epizootias agudas tempranas son la letargia, anorexia y la presencia de puntos hemorrágicos alrededor de la boca, la cavidad oral y en la base de las aletas, presentando a veces hemorragias en los filamentos de las branquias. También hay presencia de petequias en la superficie del hígado, páncreas, ciegos pilóricos, vejiga natatoria y en la musculatura lateral, agrandamiento del bazo, gónadas hemorrágicas, inflamación del intestino

con abundante y espeso liquido amarillento. Otra característica resaltante también es la exoftalmia que puede ir acompañado de hemorragias alrededor de la cavidad ocular y el iris, conllevando a veces a la ruptura de los ojos (Busch, 1983). En infecciones atípicas que a veces ocurre no hay presencia de hemorragias en la boca, ni en la cubierta branquial del pez, el pez simplemente se oscurece y nada cerca de la superficie de las pozas de cultivo (Frerichs et al, 1985)

#### **2.4.2 Epidemiología**

En ambientes acuáticos el proceso de las enfermedades también tiene la interacción entre el hospedero, el agente y el medio ambiente, así el factor medio ambiental, en sistemas acuáticos cobra mayor importancia que los posibles efectos tanto el hospedero como en el agente (Hedrick, 1998).

*Yersinia ruckeri* puede presentar peces portadores los cuales actúan como diseminadores de forma latente; pero de lenta transmisión (Coquet et al., 2002; Hamdi et al., 2005; Rakocy, 2005)

La transmisión vertical hasta ahora no ha sido demostrada y probablemente no ocurra (Dulin et al., 1976). El factor estrés en el pez juega un rol importante en la aparición de brotes la ERM, enfermedad de la “boca roja entérica”, observándose que peces portadores transmitieron *Y. ruckeri* a peces clínicamente sanos cuando la temperatura se incrementó a 25 ° C, mientras que los peces portadores no estresados no manifestaron la enfermedad. *Yersinia ruckeri* ha sido aislado a partir de heces de peces sanos portadores, meses después de un brote de la enfermedad de la “boca roja entérica” (Hunter et al., 1980).

#### **2.4.3 Diagnóstico**

Para la identificación presuntiva de la enfermedad de la “boca roja entérica”, lo primero que hay que realizar es evidenciar los signos clínicos del pez enfermo, luego se procede al aislamiento y

recuperación del agente *Yersinia ruckeri* a partir de los órganos infectados en el medio TSA (tripticosa soja agar), o en medios diferenciales como el Shotts and Waltman. Todos los medios de cultivo bacteriano para *Yersinia ruckeri* tiene una rango de 20-25 °C para su crecimiento (Furones *et al.*, 1993).

También se puede realizar la prueba de anticuerpos fluorescentes directa e indirecta, ELISA- monoclonal (Austin *et al.*, 1986), usándose esta metodología para los diferentes serotipos. La confirmación del diagnóstico de la enfermedad de la “boca roja entérica” requiere el aislamiento e identificación del agente causal, una bacteria de forma bacilar corta o cocobacilar, Gram negativa, móvil, catalasa positivo, citocromo oxidasa negativo, fermenta glucosa, descarboxila la ornitina y la lisina (Ewing *et al.*, 1978; Concha, 1998; Furones *et al.*, 1993; Bullock *et al.*, 1978).

También es conocido la reacción cruzada con antisuero entre la bacteria *Hafnia alvei* y *Yersinia ruckeri* (Stevenson and Airdrie, 1984). *Hafnia alvei* puede ser diferenciado de *Yersinia ruckeri*, siendo *H. alvei* positivo para la fermentación de la xilosa mientras *Y. ruckeri* es negativo (Buller, 2004).

También es conocido el uso del sistema API 20E, aunque existe diferencias entre ésta y los test convencionales, están incluyen el citrato, hidrólisis de la gelatina, Voges Proskauer y la prueba de nitrato. El sistema API 20E puede dar mas resultados positivos que la prueba convencional con tubos para la prueba Voges Proskauer (Davies and Frerichs, 1989).

También es importante el diagnóstico por medio de técnicas moleculares, utilizando la técnica de PCR simple y PCR múltiple, encontrándose alta sensibilidad y especificidad para detectar a la bacteria *Yersinia ruckeri* y a otros patógenos de peces (Gibello *et al.*, 1999; Del Cerro *et al.*, 2002).

#### 2.4.4 Control y Prevención

Para el control de enfermedades en acuicultura se usan antibióticos, que son administrados mediante los alimentos o también pueden ser diluidos en el agua donde se encuentran las especies cultivadas (Abbass, 2010); pero este proceso puede ejercer una presión negativa sobre el ambiente acuático con la confluencia de mantener una saludable microbiota ambiental (Stock et al., 2002; Wagle et al., 1983).

Para controlar a la bacteria *Yersinia ruckeri* se puede usar antibióticos como la oxitetraciclina y la sulfametazina, usándose individualmente o combinándose estos fármacos, pero ha habido casos en que en la enfermedad de “la boca roja entérica”, no hubo una reacción positiva ante este tipo de tratamiento, pudiendo generar resistencia ante este tipo de antibióticos (Wiens et al., 2006; Wiens y Vallejo, 2010).

Otros antibióticos como la sulfonamida, tiamulina y el ácido oxolinico han demostrado alta eficiencia para el control de esta enfermedad, in vivo (Stock et al., 2002; Capkin y Altinok, 2009)

Dentro de los antibióticos usados se puede mencionar que la oxitetraciclina, ácido oxolínico y sulfametazina son idóneos para el tratamiento de esta enfermedad, los cuales controlan el problema, sin embargo el uso de estas genera resistencias por parte de las bacterias, presentándose nuevos brotes altos y costosos. Los errores más comunes que propician la aparición de cepas resistentes, pueden darse por el uso de tratamientos no avalados por pruebas de sensibilidad, dosis bajas, interrupción o disminución del tiempo mínimo recomendado, errores de calculo, uso reiterativo de un solo antibiótico (Concha, 1998).

Para la dosificación del antibiótico en el cultivo de peces, se recomienda la administración oral, pero el inconveniente de este procedimiento es que no ayuda a tener un adecuado monitoreo de



la dosificación por animal, ante situaciones en que algunos peces podrían recibir una subdosificación en relación a la cantidad de alimento ingerido (Stock et al., 2002)

Para el control y prevención de la Yersiniosis en salmonídeos de cultivo también se puede realizar a través de vacunaciones, unido a condiciones de cultivo y manejo adecuados. Desafortunadamente, las vacunaciones no dan un 100% de protección y el uso de antibióticos aún es requerido en ciertas circunstancias (Rodgers, 1991).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de estudio**

El presente estudio se desarrollo en la Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) en la ciudad de Lima.

#### **3.2. Procedencia de las muestras**

El estudio se realizó utilizando truchas “arcoíris” (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa juvenil, provenientes de dos piscigranjas de la región Junín, la segunda región con mas alta producción de truchas, estas piscigranjas fueron “El Edén” ubicado en la provincia de Concepción, a una altitud aproximada de 3 400 msnm y la otra piscigranja fue el centro piscícola “Arco Iris”, ubicado en el distrito de Molinos en la provincia de Jauja a 3 430 msnm. Ambos muestreos realizados en los meses de Enero y Febrero del 2010.

Se tomó mediciones de la temperatura, cantidad de oxígeno disuelto y pH del agua de cultivo de cada piscigranja, donde fueron colectados las truchas.

### **3.3. Tamaño de muestra**

El numero de muestras obtenidas fue de un total de 60 trucha juveniles, de las cuales 30 eran de la piscigranja “El Edén” y las otras 30 eran del centro piscícola “Arco iris”. Los peces colectados fueron elegidos por presentar signos generales de enfermedad tales como nado errático, exoftalmia, melanosis, abdomen distendido, presencia de ulceras en la piel, retraso en el crecimiento, sin embargo es importante manifestar que los signos clínicos anteriormente mencionados también pueden presentarse para la enfermedad de la boca roja entérica en truchas.

### **3.4. Característica de la muestra**

- Parámetros biométricos: Los peces evaluados se encontraban en estadio juvenil con tallas de 10-18 cm y pesos de 20-80 gr en promedio.

### **3.5. Metodología**

#### **3.5.1. Obtención de muestras**

Los peces fueron adormecidos con Isoegenol y sacrificados mediante corte medular, luego se procedió con la necropsia de donde se tomaron muestras de bazo y riñón. Se procedió a tomar la muestra con un hisopo estéril, del riñón del segmento craneal y del bazo, en ambos se realizó un corte previamente. Posteriormente las muestras fueron colocadas en medio de transporte Stuart y transportadas en un cooler al laboratorio para realizar el análisis respectivo.

#### **3.5.2. Procesamiento de muestras**

Para realizar el análisis microbiológico, se cultivaron las muestras contenidas en el medio Stuart en medio TSA (agar tripticasa de soja), todas las muestras sembradas fueron colocadas en una estufa refrigerada, incubándolas a 22°C por 24-48 horas, pasado el tiempo se procedió a verificar el crecimiento de colonias y se

determinó las características de las colonias bacterianas obtenidas. Posteriormente, se seleccionaron las colonias que eran similares a las descritas para *Yersinia ruckeri*, colonias blanco cremosas, con un diámetro de 1 a 3 mm, redondas, lisas, y con bordes completos. Una vez seleccionadas las colonias se procedió a realizar la coloración Gram, evaluándose la morfología y tipo de coloración que esta tenía (Gram positivas o Gram negativas), identificadas esas características, cada colonia sugerente de *Yersinia ruckeri* fue colocada en un cepario para su conservación y para poder realizar las pruebas posteriores.

La identificación de *Yersinia ruckeri* se realizó mediante pruebas bioquímicas utilizando un perfil de 15 reacciones, las cuales fueron:

- ✓Catalasa
- ✓Citocromo oxidasa
- ✓Citrato
- ✓Motilidad
- ✓Producción de hidrogeno sulfurado
- ✓Producción de indol
- ✓Glucosa
- ✓Manitol
- ✓Sacarosa
- ✓Lactosa
- ✓Urea
- ✓Gelatina
- ✓Reducción de nitrato
- ✓Rojo de metilo
- ✓Lisina descarboxilasa

Cada prueba fue incubada a 22°C por 24-48 horas, pasado el tiempo se procedió a recolección de los resultados obtenidos.

### **3.5.3. Determinación del biotipo**

Una vez identificados por métodos bioquímicas las cepas de *Yersinia ruckeri*, se procedió a realizar la determinación del Biotipo de cada una de las cepas. Para la identificación del Biotipo de *Yersinia ruckeri* se procedió a determinar la motilidad de cada una de las cepas y la hidrólisis del Tween 20 y del Tween 80. Para determinar la motilidad de las cepas se procedió a realizar un examen directo al microscopio de cada una ellas, se tomó una colonia luego se colocó en una lámina porta objeto con una gota de agua destilada estéril, y se procedió a ver la movilidad de la bacteria.

Para el caso de la hidrólisis del Tween 20 y del Tween 80, se preparó el medio Agar base para Tween según lo recomendado por Sierra (1956), una vez listo el medio, cada cepa fue sembrada por estriado en este medio, incubándose a 22°C por 24 – 72 horas, pasado ese tiempo se procedió a la lectura de los resultados.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Parámetros del Agua.**

En la presente investigación se realizaron la toma de parámetros los cuales fueron la temperatura, oxígeno disuelto, y el pH. La piscigranja Arcoíris tuvo una menor calidad de agua con valores muy bajos de oxígeno (Cuadro 1).

**Cuadro 1.-** Parámetros de calidad del agua en piscigranja el “Edén y Arco iris”.

Piscigranja	Temperatura	Oxígeno disuelto	pH
“Edén”	12°C	8mg/L	6.8
“Arco Iris”	10 a 12°C	4.7 mg/L	7.9

#### 4.2. Examen de Necropsia.

Los peces obtenidos en el presente estudio se caracterizaron por presentar signos generales de enfermedad en los peces, siendo los principales: nado errático, exoftalmia(Figura 1), melanosis (Figura 2), abdomen distendido, presencia de ulceras en la piel (Figura 3), peces retrasados (Figura 2) (Cuadro 2), es importante manifestar que los signos clínicos anteriormente mencionados también pueden presentarse para la enfermedad causada por *Y. ruckeri* en truchas arcoiris, sin embargo no hubo presencia de hemorragias a nivel de la boca, característica de dicha enfermedad.

**Figura 1.** Trucha con exoftalmia y ojos hemorrágicos.

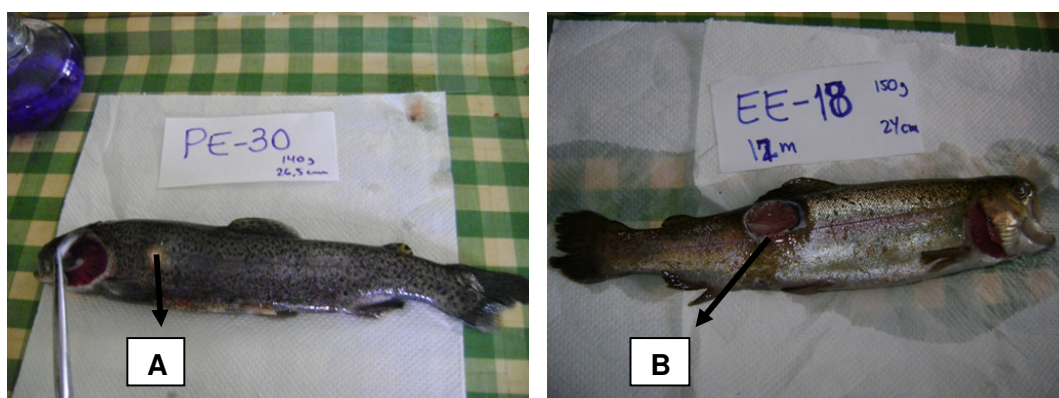


A: La flecha indica a una marcada exoftalmia con presencia de hemorragia a nivel del ojo.

**Figura 2.** Trucha con melanosis.



**Figura 3.** Ulceras en piel.



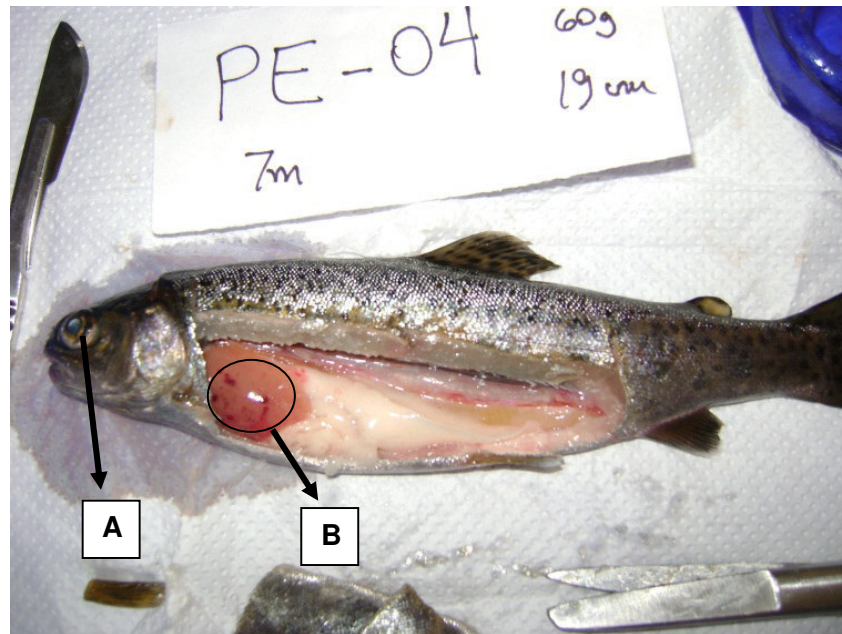
**A y B:** Se observa lesionen leve a nivel tegumentario y ulceras en piel respectivamente.

**Cuadro 2.** Lesiones macroscópicas externas observadas a la necropsia de truchas arcoíris procedentes de las piscigranjas Edén y Arcoíris.

Lesiones externas	Piscigranja “El Edén”		Piscigranja “Arcoíris”	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Úlceras en tegumento	5/30	16.7	2/30	6.7
Exoftalmia	8/30	26.7	2/30	6.7
Melanosis	4/30	13.3	18/30	60.0

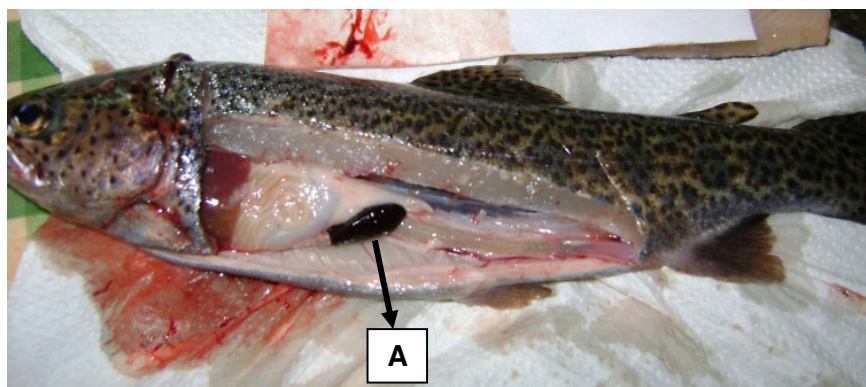
A la apertura, se evidenciaron lesiones asociadas a hemorragias de tipo petequiral en la serosa de diversos órganos del tracto digestivo, siendo el hígado el de mayor frecuencia, de presentación y de manera escasa a nivel de los ciegos pilóricos (Figura 4). Por otro lado también se observó una leve frecuencia de hígados pálidos y esplenomegalia (Figura 5) (Cuadro 3).

**Figura 4.** Trucha con Exoftalmia y con petequias en Hígado



A: Exoftalmia      B: Petequias en hígado.

**Figura 5.** Trucha con esplenomegalia



A: La flecha indica esplenomegalia.



**Cuadro 3.** Lesiones macroscópicas internas observadas a la necropsia de truchas arcoíris

procedentes de las piscigranjas el Edén y Arcoiris.

Lesiones internas	Piscigranja “El Edén”		Piscigranja “Arcoiris”	
	Frecuencia	Porcentaje (%)	Frecuencia”	Porcentaje (%)
Hígado con petequias	15/30	50.0 %	13/30	43.3 %
Hígado pálido	18/30	60.0 %	28/30	93.3 %
Ciegos pilóricos con petequias	1/30	3.3 %	4/30	13.3 %
Esplenomegalia	24/30	80.0 %	9/30	30.0 %
Hígado pálido	18/30	60.0 %	28/30	93.3 %

**4.3. Análisis Microbiológico.**

El aislamiento de la bacteria *Yersinia ruckeri* se realizó en agar tripticasa de soja (TSA), donde fueron sembradas e incubadas a 22°C por 24-48 horas, en dicho agar se obtuvieron un total de 65 aislados de ambas piscigranjas (Cuadro 4), las cuales presentaban colonias semejantes a las reportadas para *Y. ruckeri*, como ser de color blanco cremosos, redondas con diámetros de 1 a 2 mm, lisas, bordes completos, ligeramente convexas, y la mayoría presentaba un olor característico, como se sabe esta bacteria pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, para su comprobación, a los aislados obtenidos se les procedió a realizar la prueba de Gram, oxidasa y catalasa.

**Cuadro 4:** Bacterias aisladas en las piscigranjas el Edén y Arco iris.

<b>Bacterias aisladas</b>	
<b>Piscigranja “El Edén”</b>	21
<b>Piscigranja “Arco Iris”</b>	44
<b>Total</b>	65

Del total de 65 bacterias aisladas, a la coloración Gram se identificaron un total de 28 bacterias Gram negativas entre las aisladas de las piscigranjas “El Edén” y “Arco iris”.

**Cuadro 5:** Identificación por coloración Gram.

	<b>Bacterias Gram Positivas</b>	<b>Bacterias Gram Negativas</b>
<b>Piscigranja “El Edén”</b>	7	14
<b>Piscigranja “Arco Iris”</b>	30	14
<b>Total</b>	37	28

De las 28 bacterias Gram negativas con morfología cocobacilar, 19 resultaron positivos a la prueba de la catalasa y negativas a la prueba de oxidasa, características presuntivas de pertenecer a la familia de las enterobacterias (Cuadro 6).

**Cuadro 6:** Enterobacterias identificadas en las piscigranjas el Edén y Arco iris

		Enterobacterias	Otros
Piscigranja	“El Edén”	9	5
Piscigranja	“Arco Iris”	10	4
Total		19	9

A las 19 aislados identificados como enterobacterias, se les procedió a realizar pruebas bioquímicas para la identificación del genero y la especie, obteniendo un total de 9 cepas con características bioquímicas semejantes a la bacteria *Y.ruckeri*, siendo estas Gram negativas, positivos para la prueba de catalasa y negativos para la prueba de la oxidasa, positivos a la prueba del rojo de metilo y motiles. Ninguna cepa produjo indol, ni hidrogeno sulfurado, tampoco fermentaron la sacarosa ni lactosa, todas las cepas fermentaron la glucosa y el manitol, además descarboxilaron la lisina, y redujeron el nitrato. Ninguna cepa metabolizó la urea.

Tres de los nueve fueron aisladas en la piscigranja “El Edén” y seis en la piscigranja “Arco Iris” (Cuadro 7).

**Cuadro 7:** Pruebas bioquímicas para la identificación del género y especie en las piscigranjas el Edén y Arco iris

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rojo Metilo	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Motilidad en SIM	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Degradación de : Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación de:									
Glucosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Manitol	+	-	+	-	+	+	-	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Cepa Presuntiva de <i>Yersinia ruckeri</i>			P		P	P			

+: positivo    -: negativo    P: positivo a *Yersinia ruckeri* Piscigranja “Arco Iris”

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rojo Metilo	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
Motilidad en SIM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Degradación de : Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación de:										
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Reducción de nitratos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Lisina	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Cepa Presuntiva de <i>Yersinia ruckeri</i>		P	P	P	P	P			P	

+: positivo    -: negativo    P: positivo a *Yersinia ruckeri*

#### 4.4. Análisis de Biotipos.

A cada cepa identificada a través de pruebas bioquímicas como *Yersinia ruckeri* se procedió a realizar pruebas para determinar si pertenecían al Biotipo 1 o 2 mediante la hidrólisis o no del Tween 20, Tween 80 y la presencia o ausencia de la motilidad respectivamente, obteniendo los siguiente: en el caso de las cepas aisladas de la piscigranja “Arco Iris” todas las cepas evidenciaron un halo de precipitación tanto en el medio con Tween 20 como con el Tween 80, lo que significaría que todas la cepas analizadas resultaron positivas para ambos Tween, además se hizo un examen directo de las cepas con una gota de agua destilada y miradas directamente al microscopio, todas las cepas evidenciaron motilidad, lo que indicaría que las cepas aisladas en la piscigranja “Arco Iris” todas son *Yersinia ruckeri* biotipo 1.

En el caso de las cepas identificadas como *Y.ruckeri*, de la piscigranja “El Edén”, de las 3 cepas identificadas como tal, se encontró que una no evidenciaba motilidad ni tampoco presentaba halos de precipitación en el medio con los Tween, lo que indicaría que esta cepa pertenece al biotipo 2. Así en la presente investigación se obtuvieron 8 cepas de *Y. ruckeri* del biotipo 1 y solo una cepa del biotipo 2. La única cepa de *Y.ruckeri* biotipo 2 fue aislada en la piscigranja “El Edén” (Cuadro 8) ubicada en la cuenca del río Achamayo.

**Cuadro 8:** Determinación de Biotipos.

Cepa		Tween 20	Tween 80	Motilidad en Fresco
Piscigranja “El Edén”	3	+	+	+
	5	-	-	-
	6	+	+	+
Piscigranja “Arco Iris”	2	+	+	+
	3	+	+	+
	4	+	+	+
	5	+	+	+
	6	+	+	+
	9	+	+	+

## 5. DISCUSIÓN

A nivel mundial en la industria piscícola la yersiniosis o enfermedad de la “boca roja entérica”, ha sido una de las enfermedades que mayor impacto económico ha causado (Furones *et al.* 1993; Tobback, 2009), en nuestro país se conoce de esta enfermedad desde el 2002, donde fue reportada por primera vez en piscigranjas de la región Junín (Bravo & Kojagura, 2004), desde entonces se han hecho investigaciones acerca de esta bacteria pero aun son muy escasas, existiendo poca información sobre el desarrollo de esta enfermedad y otras de etiología bacteriana (Bravo & Kojagura, 2004; Fernández, 2011).

Hoy en día se esta tomando mas importancia a esta enfermedad por estar relacionada con altas mortalidades en piscigranjas de la región Junín, por ello es importante saber cual es la situación actual de esta enfermedad, así como conocer exactamente las características fenotípicas de este agente en nuestro medio como lo relacionado a los biotipos debido a que estas características estarían involucradas dentro de la patogenicidad del mismo. Estos conocimientos ayudarían a realizar manejos sanitarios para prevenir los posibles impactos que puedan ocasionar en las piscigranjas, teniendo de esa manera herramientas para disminuir los daños causados.

De los resultados obtenidos para evaluar la calidad del agua de las piscigranjas, obtuvimos que en la piscigranja “El Edén” no se evidenció ningún parámetro fuera de lo normal, tanto la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto se encontraban dentro de los rangos apropiados para el cultivo de las truchas. En la piscigranja “Arco iris” los datos obtenidos de la temperatura así como en el pH, también se encontraron dentro de los parámetros normales, sin embargo la cantidad de oxígeno disuelto estaba cerca al mínimo requerido para un buen cultivo de trucha, este valor obtenido pudo ser una de las causantes para ocasionar estrés en los peces, conllevando con ello a la susceptibilidad a la infección de algún o varios potencialmente patógenos, como la afección por *Yersinia ruckeri*. Además es importante resaltar que se aislaron más cepas de *Y. ruckeri* en la piscigranja “Arco iris” que en la del “Edén”, este hecho podría estar relacionado por la falta de calidad del agua que presentaba la piscigranja “Arco iris” similar a lo reportado por Baca (2012) quien también encontró deficiencias en la cantidad de oxígeno disuelto en dicha piscigranja, el valor obtenido de



oxígeno disuelto en comparación de los datos reportados por Godoy (2004) se encuentran fuera del rango permisible.

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, de los aislados de la piscigranja “El Edén”, determinaron que era la bacteria *Yersinia ruckeri*, resultados similares a los obtenidos por Buller (2004), Furones(1993) y Concha (1998), en otros salmónidos. En esta piscigranja se logró aislar un total de 3 cepas de *Y. ruckeri*, la mayoría a partir del riñón del pez, como se menciona en otros trabajos (Tobback, 2009; Fernandez, 2011). Esto es debido a que esta bacteria produce septicemia y el riñón de los peces es un órgano linfohematopoyetico sobre todo en la parte anterior y altamente vascularizado lo cual permitiría que se pueda establecer esta bacteria en ese nivel, ser retenido por los melanomacrofagos y tener una mayor probabilidad de aislar a la bacteria.

Respecto a los biotipos de *Y. ruckeri*, se determinó la presencia de ambos biotipos, se puede observar que las características bioquímicas para estas cepas aisladas, se asemejan al biotipo originalmente descrito de Hagerman, la mayoría presentaba motilidad y la hidrólisis del tween 20 y 80, sin embargo en la presente investigación se aisló una cepa que no presentó las características anteriormente mencionadas, esta cepa no presentó motilidad ni tampoco hidrolizó los Tween, lo que indica que se trata de una cepa de *Y. ruckeri* biotipo 2, similar a lo determinado en investigaciones de Chile donde también incluyen dentro de sus aislados a ambos biotipos de *Yersinia ruckeri*, manifestando que el biotipo 2 es un grupo muy definido dentro de los aislados de Inglaterra, Noruega y también en Alemania (Concha, 1998), además es importante mencionar que en Australia se considera a *Yersinia ruckeri* Biotipo 2 como enzoótico para ese país a diferencia del biotipo 1 que raras veces es encontrado (Carson & Wilson, 2009), algo característico en la presente investigación también es el hecho que manifiestan diversos autores, que muchos peces no evidencian, la boca roja, signo clásico de la enfermedad, lo que se observó también en la presente investigación, ya que ninguna de las truchas analizadas presentó la característica típica de la “ boca roja ” (Concha, 1998; Tobback, 2009; Carson & Wilson, 2009; Sierralta, 2011; Fernández, 2011; Bueno, 2012) ,

Existen aun pocos estudios desarrollados en nuestro país acerca de los biotipos presentes en cepas de *Yersinia ruckeri* (Bastardo, 2011; Bueno *et al.*, 2012). En el 2011 Bastardo *et al.* aisló 5 cepas de *Y. ruckeri* biotipo 2 de un total de 30, lo que indicaría que en otras piscigranjas de nuestro país también hay la presencia de *Y. ruckeri* biotipo 2, hecho que pone de manifiesto la presencia de este biotipo en piscigranjas del país. Además también es importante mencionar el hecho de la presencia de este biotipo en nuestro medio, ya que este biotipo es un grupo que está causando muchos problemas sanitarios, aumentando la frecuencia de la enfermedad de la boca roja entérica, en peces previamente vacunados, en piscigranjas de Estados Unidos y de Europa (Welch *et al.*, 2011), además es necesario saber cuál ha sido la ruta de ingreso a nuestro país ya que este biotipo según algunos autores, es un biotipo que ha perdido el flagelo y actividad lipolítica, por la necesidad a la resistencia de la vacuna por inmersión en peces de cultivo, y que el uso prolongado de esta vacuna ha servido como presión selectiva para que surgieran las variantes de *Y. ruckeri* no móviles (Fouz *et al.*, 2006), lo que haría suponer que las proteínas flagelares podrían ser un componente importante de protección de las vacunas de inmersión de Yersiniosis (Ramos *et al.*, 2004; Steiner, 2007; Tsujita, *et al.*, 2006; Tsujita, *et al.*, 2004). Este hecho es importante porque se ha determinado la presencia de *Yersinia ruckeri* biotipo 2 en nuestro país, y teniendo en cuenta lo mencionado por otros investigadores, esto se da por la vacunación por inmersión, sin embargo en nuestro país no se ha desarrollado hasta el momento ningún tipo de vacunación para esta bacteria (Fernández, 2011; Bueno, 2012) de lo que se podría inferir que las cepas de *Y. ruckeri* biotipo 2 encontradas han tenido que ingresar a nuestro país de alguna manera que debe ser motivo de investigación.

Finalmente la presente investigación ayudó a determinar la presencia de *Yersinia ruckeri* en las piscigranjas evaluadas, además también los biotipos presentes en estas, con ello podemos contar con herramientas para mejorar nuestro control sanitario, evitando con ello grandes pérdidas económicas en la industria acuícola, la cual está en constante crecimiento, y aun así no se han realizado normas sanitarias para el control de las diferentes enfermedades en las truchas.

## **6. CONCLUSIONES**

- Se determinó la presencia de la bacteria *Yersinia ruckeri*, en las dos piscigranjas de estudio en la región Junín.
- Se determinó la presencia de *Yersinia ruckeri* biotipo 1 en las dos piscigranjas de estudio en la región Junín.
- Se determinó la presencia de *Yersinia ruckeri* biotipo 2 solo en una de las piscigranjas en estudio.
- Se aisló un alto número de bacterias Gram positivas que podrían estar asociados a las enfermedades producidas en truchas arcoíris.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Akhlaghi, M. and Sharifi Yazdi, H. 2008. Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University 4: 347-352.
- Bravo, S. and Kojagura, V. 2004 . First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol 2: 104.
- Buller, N. B. 2004. Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals A Practical Identification Manual. Department of Agriculture South Perth Western Australia.
- Bullock G.L., a. Anderson D. B.1984. Immunization against *Yersinia ruckeri*, cause of enteric redmouth disease. P. de Kinkelin, ed. Symposium on fish vaccination Office International des Epizooties, 151- 166.
- Bullock, G. L., Stuckey, H. M., & Shotts, E. B. 1978a. Enteric redmouth bacterium: comparison of isolates from different geographic areas. Journal of Fish Diseases 4:351-356.
- Busch, R. A. 1982. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In Antigenes of Fish Pathogens. Symposium Internacional de Talloires., 201 - 223.
- Busch, R. A. 1983. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). Antigenes of fish pathogens. Collection Fondation Marcel Merieux, Lyon, France, 201-222

- Coquet, L., Cosette, P., Quillet, L., Petit, F., Junter, G.-A., and Jouenne, T. 2002. Occurrence and Phenotypic Characterization of *Yersinia ruckeri* Strains with Biofilm-Forming Capacity in a Rainbow Trout Farm. *Applied and Environmental Microbiology* 2:470-475.
- Danley, M. L., Goodwin, A. E., and Killian, H. S. 1999. Epizootics in farm-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), caused by the enteric redmouth bacterium *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 6: 451-456.
- Davies R.L. 1991. Outer membrane protein profiles of *Yersinia ruckeri*. *Veterinary Microbiology* 1-2: 125-140.
- Davies, R. L., and Frerichs, G. N. 1989. Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *Journal of Fish Diseases* 4:357-365.
- Dulin, M. P., T. Huddleston, R. E. Larson, and G. W. Klontz. 1976. Enteric redmouth disease. Univ. Idaho, Moscow, For. Wildl. Range Exp. Stn., Contrib.16: 15.
- Evenhuis, J. P., LaPatra, S. E., Verner-Jeffreys, D. W., Dalsgaard, I., and Welch, T. J. 2009. Identification of Flagellar Motility Genes in *Yersinia ruckeri* by Transposon Mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 20: 6630-6633.
- Ewing, W. H., Ross, A. J., Brenner, D. J., and Fanning, G. R. 1978. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the Redmouth (RM) Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1: 37-44.

- Fernández, L., Márquez, I., and Guijarro, J. A. 2004. Identification of Specific In Vivo-Induced (ivi) Genes in *Yersinia ruckeri* and Analysis of Ruckerbactin, a Catecholate Siderophore Iron Acquisition System. *Applied and Environmental Microbiology* 9: 5199-5207.
- Frerichs, G. N., Stewart, J. A., and Collins, R. O. 1985. Atypical infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 4: 383-387.
- Furones, M. D., Gilpin, M. J., Alderman, D. J., and Munn, C. B. 1990. Virulence of *Yersinia ruckeri* serotype I strains is associated with a heat sensitive factor (HSF) in cell extracts. *FEMS Microbiol Lett* 1-3: 339-343.
- Furones, M. D., Rodgers, C. J., and Munn, C. B. 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3: 105-125.
- Godoy, M. 2002. *Truchicultura*. 2° Edición. Perú: Editorial Perú, 247
- Hamdi AVCI, S. S. B. 2005. Pathological Findings in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Experimentally Infected with *Yersinia ruckeri*. *Turk J Vet Anim Sci*, 29: 1321-1328.
- Hunter, V. A., Knittel, M. D., & Fryer, J. L. 1980. Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 6: 467-472.

- McArdle, J. F., and C. Dooley-Martyn. 1985. Isolation of *Yersinia ruckeri* type I(Hagerman strain) from goldfish *Carassius auratus*. Bull. Eur. Assoc, Fish Pathol 5:10-11.
- Michel, C., B. Faivre, and P. de Kinkein. (1986). A clinical case of enteric redmouth in minnows (*Pimephales promelas*) imported in Europe as bait-fish. Bull.Eur.Assoc. Fish Pathol 6: 97-99.
- Mitchum, D. L. 1981. Concurrent infections: ERM and furunculosis found in emerald shiners. Fish Health Section/American Fisheries Society Newsletter 4: 2.
- O'Leary, P. J., J.S. Rohovec y J.L. Fryer. 1979. A further characterization of *Yersinia ruckeri* (enteric redmouth bacterium). Fish Pathology 2: 71-78.
- Romalde, J. L., Conchas, R. F., and Toranzo, A. E. 1991. Evidence that *Yersinia ruckeri* possesses a high affinity iron uptake system. FEMS Microbiology Letters 2-3: 121-125.
- Smith, G. R., and Stearley, R. F. 1989. The Classification and Scientific Names of Rainbow and Cutthroat Trout. Fisheries 1: 4-10.
- Stevenson, R. M. W., and Airdrie, D. W. 1984. Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. Journal of Fish Diseases 4: 247-254.
- Stevenson, R. M. W., & Daly, J. G. 1982. Biochemical and Serological Characteristics of Ontario Isolates of *Yersinia ruckeri*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 6: 870-876.

- Tobback, E. 2009. Early pathogenesis of *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Faculty of Veterinary Medicine Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases.
- Vigneulle M.1990. Yersinose des salmonides: etude comparee de differents modes de vaccination. *Ichthyophysiological Acta* 13: 43-58.
- Wobeser, G. 1973. An Outbreak of Redmouth Disease in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) in Saskatchewan. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 4: 571-575.